

Obsah

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ OBSAHU VODY VE FARMACEUTICKÉM PRŮMYSLU	11
2.1.1	<i>Titrační metody</i>	11
2.1.2	<i>Destilace</i>	11
2.1.3	<i>Gravimetrie</i>	12
2.2	STANOVENÍ VODY KARL-FISCHEROVOU METODOU.....	12
2.2.1	<i>Karl Fischer</i>	12
2.2.2	<i>Princip metody</i>	13
2.2.3	<i>Úskalí metody</i>	15
2.2.4	<i>Používaná činidla</i>	17
2.2.5	<i>Aplikace se zaměřením na farmaceutické vzorky</i>	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	ANALYZOVANÝ VZOREK	22
3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ČINIDLA.....	22
3.3	INFORMACE O PŘÍSTROJÍCH	22
3.4	PRACOVNÍ POSTUP.....	23
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1	PODMÍNKY, KTERÉ MOHOU OVLIVNIT PRŮBĚH TITRACE	25
4.2	NALEZENÍ OPTIMÁLNÍHO SLOŽENÍ ROZPOUŠTĚCÍ SMĚSI	26
4.3	ZVĚTRÁVÁNÍ VZORKU	27
4.4	STANOVENÍ OBSAHU VODY VE VYTVOŘENÉ MINIATURNÍ VÁŽENCE.....	29
4.5	ZTRÁTA SUŠENÍM	30
4.6	VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ	31
5	ZÁVĚR	32
6	POUŽITÁ LITERATURA	33

1 Úvod

Akvametrie je velmi důležité odvětví chemické analýzy, protože koncentrace vody v nejrůznějších látkách má podstatný vliv na fyzikální vlastnosti látek a na průběh mnoha chemických reakcí. Ve farmacii se jedná především o spékavost látek, což je problematické především při výrobě tablet, dále snížení obsahu žádané látky ve vzorku či snížení trvanlivosti především přírodních materiálů.

Pro stanovení vody bylo vypracováno mnoho metod. Pravděpodobně nejstarší jsou metody vysoušecí, dále destilační metody, metody absorpční a různé fyzikálně chemické metody jako je měření indexu lomu, vodivostní měření, IČ, měření viskozity aj.

Jednou z nejrozšířenějších a nejuniverzálnějších metod je titrace, kterou zavedl roku 1935 K.Fischer.

2 Teoretická část

2.1 Metody používané pro stanovení obsahu vody ve farmaceutickém průmyslu

2.1.1 Titrační metody

2.1.1.1 Karl-Fischerova metoda

Tato metoda využívá chemické reakce vody, obsažené v materiálu, se specifickými činidly (viz kapitola 2.2).

Je to téměř nejčastěji používaná metoda pro velké rozmezí stanovitelného obsahu vody ve vzorku, dostatečnou přesnost, selektivitu a rychlost stanovení.

2.1.1.2 Coulometrická metoda

Při coulometrické titraci se elektrický proud udržuje na předem zvolené konstantní hodnotě. Stanovovaná látka reaguje s účinnou látkou generovanou na elektrodě elektrolyzou vhodného elektrolytu. Měří se náboj, který je nutný k úplné přeměně stanovované látky. Bod ekvivalence se indikuje instrumentálně biamperometricky.

Touto metodou se měří velmi malé obsahy vlhkosti jak v pevných tak kapalných vzorcích.

2.1.2 Destilace

Principem této metody je vytvoření azeotropní směsi toluen-voda. Vzorek je vkládán do tohoto média a voda z něj pak oddestilována do kalibrovaného jímadla. Obsah vody je poté stanoven volumetricky. Touto metodou se dají analyzovat jak vzorky pevné tak i kapalné, podmínkou je ale dostatečně velký obsah vody a vysoký bod varu.

Tato metoda je, však téměř nevyužívána.

2.1.3 Gravimetrie

Stanovení vody ztrátou sušením je jednou z nejstarších a nejrozšířenějších technik sloužících ke stanovení vody. Voda se ze vzorku odstraní za stanovených podmínek a její množství se zjišťuje podle úbytku hmotnosti po sušení. Sušení se provádí v sušárně nebo exsikátoru, za atmosférického tlaku nebo za vakua, jak samostatně tak i se sušidlem (oxidem fosforečným) při daném teplotním rozmezí nebo laboratorní teplotě buď přímo ve vážence nebo příliš lepkavé vzorky smísené s pískem. Tyto podmínky pro analyzované látky určuje lékopis především dle jejich vlastností. Touto metodou se většině případů stanovují látky pevné.

Gravimetrie je poměrně často používanou jednoduchou a efektivní metodou, její úskalí spočívá ale v tom, že se takto nestanoví pouze voda, ale i jiné těkavé látky ve vzorku obsažené.

2.2 Stanovení vody Karl-Fischerovou metodou

2.2.1 Karl Fischer

Německý chemik Karl Fischer (viz *obr. 1*) se narodil 24.3.1901. Jeho velkým snem

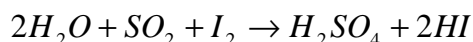


Obrázek 1 - Karl Fischer¹²

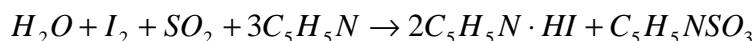
bylo studium chemie. Vystudoval institut fyziky a chemie Univerzity Leipzig a poté pracoval pro německou ropnou společnost DEA Group, kde se stal vedoucím výzkumných laboratoří. V roce 1935 zavedl jednu z nejrozšířenějších a nejuniverzálnějších metod pro stanovení vody titrací. O 23 let později roku 1958 ve věku 57 let umírá.

2.2.2 Princip metody

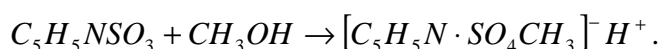
Karl-Fischerova metoda vychází z Bunsenovy reakce:



a je založena na reakci vody s titračním činidlem, které je složeno z jodu a oxidu siřičitého rozpuštěného v bezvodém methanolu a pyridinu, ve vhodném nevodném prostředí. Tato reakce je velmi složitá a lze přibližně vystihnout dvěma následujícími reakcemi:



a



Z těchto reakcí vyplývá, že jednomu molu vody odpovídá jeden mol jodu.

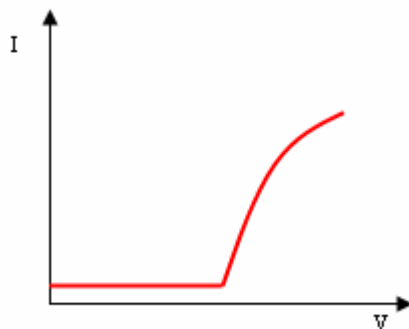
V podstatě jde o jodometrickou titraci s elektrodově reverzibilním redoxním systémem $I_2/2I^-$. Tato titrace může být indikována vizuálně, ale v naprosté většině se používá biamperometrické, ale i bipotenciometrické indikace bodu ekvivalence se dvěma polarizovatelnými platinovými elektrodami.

2.2.2.1 Biamperometrická titrace

Biamperometrické titrace se provádějí v míchaném roztoku s dvojicí stejných elektrod (nejčastěji platinových), na které se vkládá konstantní napětí (od několika mV až po asi 1,5 V). Při titraci se měří proud galvanometrem.

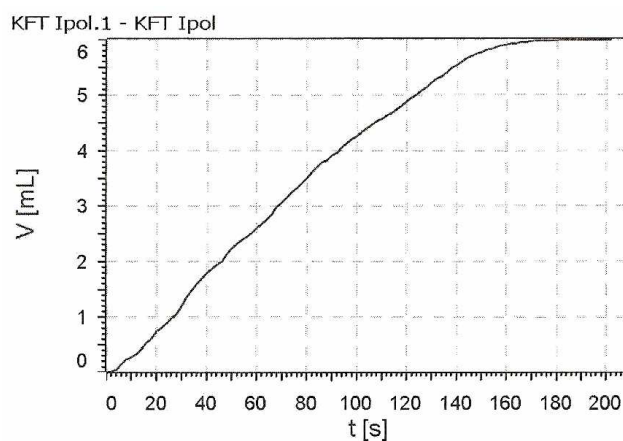
Jako titrační křivka se vynáší závislost proudu na objemu přidávaného titračního činidla. Při průchodu proudem se automaticky stává jedna z těchto elektrod katodou a druhá anodou. Katodický a anodický proud musí být v absolutní hodnotě stejné. Velikost proudu při daném napětí tedy ovlivňuje ta složka z dvojice (katodicky redukovatelná nebo anodicky oxidovatelná), které je v roztoku méně. Ve chvíli, kdy jedna z těchto složek chybí, proud je nulový a nastává bod ekvivalence.

Při titraci vody Karl-Fischerovým činidlem způsobuje voda polarizaci katody a brání průchodu proudem roztokem. V bodě ekvivalence, kdy již všechna voda zreagovala, se katoda depolarizuje a tím nastává náhlý vzrůst proudu (viz obr.2), který se zaznamenává vhodným elektrickým přístrojem.



Obrázek 2 - Závislost proudu na objemu přidaného činidla

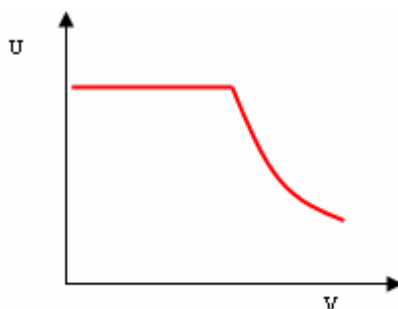
Automatické titrátory, však ve většině případů nezaznamenávají závislost proudu na objemu titračního činidla, nýbrž závislost objemu titračního činidla na čase. Zjišťuje se pak trvání výchylky proudu. Bod ekvivalence je pak dán objemem kdy výchylka proudu při jeho náhlém vzrůstu setrvala alespoň 1 minutu (viz obr. 3).



Obrázek 3 - Titrační křivka vyhodnocená programem Tiamo^o

2.2.2.2 Bipotenciometrická titrace

Podobně jako u biamperometrických titrací se pracuje s dvojicí polarizovatelných elektrod, avšak místo konstantního napětí se na ně vkládá konstantní proud. To znamená, že tam, kde je u biamperometrické titrace minimální proud, musí být u bipotenciometrické titrace vloženo větší napětí a naopak. Bipotenciometrické titrační křivky jako závislosti vložení napětí na objemu přidávaného činidla jsou proto vůči biamperometrickým otočené (viz obr. 4).



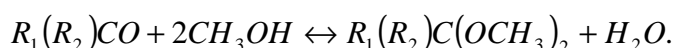
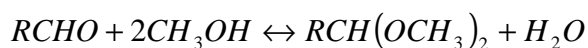
Obrázek 4 - Závislost napětí na objemu přidaného činidla

2.2.3 Úskalí metody

2.2.3.1 Reakce Fischerova činidla s jinými látkami než s vodou

Kromě vody může s činidlem reagovat řada dalších sloučenin. Může docházet k reakcím určitých látek s nějakou jinou složkou titračního systému, čímž se ruší stanovení vody. Těmito látkami mohou být např. silné kyseliny, u nichž hrozí nebezpečí esterifikace s methanolem, kterou lze potlačit rozpuštěním vzorku v pyridinu nebo v jeho směsi s dioxinem. Dále ruší kyselina askorbová a merkaptany, které jsou oxidovány jodem činidla. Tuto reakci lze potlačit jejich adicí na olefiny, katalyzovanou fluoridem boritým. Pro titraci xanthátů musí být vzorek dispergován v chloroformu. Z anorganických látek ruší oxidy a hydroxidy kovů, uhličitany, thiosířany, chloridy železité a cínaté kvantitativně reagující s činidlem, kyselina boritá a oxidy, jež esterifikují s methanolem, či chlorid a síran měďnatý redukující s jodovodíkem. V případě většiny těchto látek musí být voda separována před stanovením (extrakcí, destilací).

Z organických látek ruší stanovení vody především karbonylové sloučeniny (aldehydy a ketony) tvorbou acetalů (viz níže uvedené rovnice):



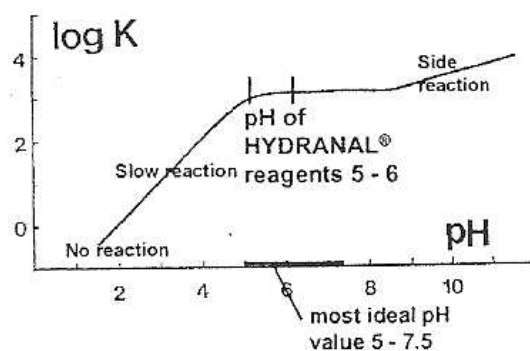
Jak z rovnic vyplývá, stanovení obsahu vody v aldehydech a ketonech je komplikováno tím, že obě tyto skupiny látek reagují s methanolem za vzniku vody, což vede k falešně pozitivním výsledkům, popř. k tomu, že není dosaženo koncového bodu titrace. Pro stanovení obsahu

vody v aldehydech a ketonech byla tedy vyvinuta firmou Riedel-de Haën speciální činidla, která methanol neobsahují (viz kapitola 2.2.4).

2.2.3.2 Vliv pH na titraci

Rychlost, kterou probíhá stanovení obsahu vody titrací podle Karl Fischera, je ovlivněna hodnotou pH směsi rozpouštědla a analytu v titrační nádobce. Při výzkumech firmy Riedel-de Haën bylo zjištěno optimální pH pro KF titraci, které se nachází v rozmezí 5,0-7,5. Při pH menším než 5 se reakce zpomaluje až se při hodnotě 1 téměř zastaví, při pH nad 7,5 začíná docházet k rozkladu činidel (viz obr.5).

Influence of the pH on the KF reaction



Obrázek 5 - Vliv pH na KF titraci¹¹

2.2.3.3 Rozpustnost látek v médiu

Ne všechny látky se v methanolu dobře rozpouštějí. Z tohoto důvodu se pro různé vzorky používají jako médium různé směsi rozpouštědel. Zvláště problematické se v tomto směru jeví oleje, přírodní látky a cukry.

Pro oleje lze s výhodou použít směs xylenu a methanolu, kdy xylen zároveň zabraňuje pokrytí elektrody vzorkem. I zde firma Riedel-de Haën vyvinula speciální média, vhodná pro analýzu těchto vzorků (viz kapitola 2.2.4).

Pro cukry a další přírodní látky je vhodné použít směsi formamidu a methanolu, kdy formamid výrazně zlepšuje jejich rozpouštění nebo může působit i jako extrakční činidlo.

2.2.4 Používaná činidla

Původní titrační roztok byl složen (jak je výše uvedeno) z jodu a oxidu siřičitého rozpuštěného v bezvodém methanolu a pyridinu. Roztok se dá připravit buď přímou přípravou celého roztoku, který je použitelný až po dvou dnech po přípravě, protože se zpočátku během prvních 24 hodin velmi rychle rozkládá, nebo lze použít činidlo složené ze dvou roztoků, které jsou poměrně stabilní. Roztok I tvoří oxid siřičitý ve směsi bezvodého methanolu a pyridinu a roztok II obsahuje jod a bezvodý methanol. Vzorek se pak přidává k „předtitrovanému“ roztoku I a titrace se provede roztokem II.

Jelikož původní metoda používá pro titraci toxický pyridin, Firma Riedel-de Haën, která je součástí společnosti Sigma-Aldrich, započala v roce 1979 výzkum vedený Dr. Eugenem Schulzem, jehož výsledkem bylo nahrazení pyridinu imidazolem a vznik činidel pro Karl Fischerovy titrace s názvem HYDRANAL. Imidazol oproti pyridinu posouvá rovnováhu níže uvedené reakce výrazně doprava.



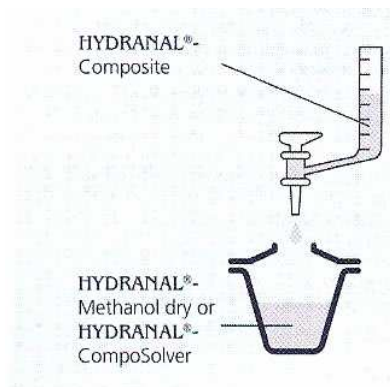
kde RN je báze a $[RNH]SO_3CH_3$ je meziprodukt

Reakce probíhá rychleji, koncový bod je stabilní a dosahuje se vyšší přesnosti stanovení.

Vývoj řady HYDRANAL stále pokračuje. Pozornost byla zaměřena na ochranu životního prostředí, bezpečnost práce a zlepšení pracovních medií, pro snadnější rozpouštění problematických vzorků a optimalizaci podmínek pro vlastní KF titraci.

2.2.4.1 Jednosložková činidla řady HYDRANAL

Jednosložková činidla jsou nejčastěji používanými titračními činidly pro stanovení vody Karl-Fischerovou metodou. Jsou schopné stanovit obsah vody od 0-100 % a jsou vhodné i pro titrace ketonů.



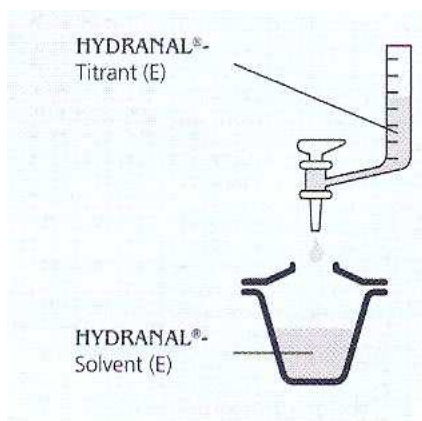
Obrázek 6 - KF titrace jednosložkovým činidlem⁷

Titrační činidlo HYDRANAL-Composite obsahuje všechny reagenty potřebné pro KF titraci (jód, oxid siřičitý, imidazol a 2-methylimidazol) rozpuštěné v dietylenglykolu monoethyl eteru, který zároveň zaručuje i stabilitu roztoku (výrobce uvádí pokles titru pouhých 5 % z původní hodnoty za rok). HYDRANAL-Composite se vyrábí ve třech koncentracích – 5 mg/ml, 2 mg/ml a 1 mg/ml, jeho speciální formou je pak HYDRANAL-Composite 5K o koncentraci 5 mg/ml určený pro titraci vody v aldehydech a ketonech.

Jako **pracovní médium** se dá použít bezvodý methanol, nebo speciální média řady HYDRANAL, které buď upravují pH (Methanol Rapid), nebo jsou vhodné pro titraci nepolárních látek tuků a olejů (LipoSolver), nebo jsou určeny k titraci vody v aldehydech a ketonech (Medium K, KetoSolver) a nebo jsou pouze zaměřeny na netoxicitu rozpouštědla (CompoSolver E).

2.2.4.2 Dvousložková činidla řady HYDRANAL

Dvousložková činidla jsou rozdělena na pracovní médium HYDRANAL-Solvent a titrační roztok HYDRANAL-Titrant. HYDRANAL-Solvent obsahuje oxid siřičitý a imidazol v methanolu a HYDRANAL-Titrant je roztok jodu v methanolu s přesnou koncentrací. Dvousložková činidla mají přesný a stabilní titr, vysokou pufrací kapacitu, titrace s nimi probíhá rychle a malé obsahy vody jsou stanovovány s větší přesností.



Obrázek 7 - KF titrace dvousložkovým činidlem⁷

Titrační činidla HYDRANAL-Titrant jsou vyráběny ve dvou koncentracích – 5 mg/ml a 2 mg/ml. Nově je zavedena i řada E, kde byl toxický methanol nahrazen ethanolem.

Pracovní médium HYDRANAL-Solvent je buď v klasickém provedení, nebo s methanolem nahrazeným ethanolem (řada E) a nebo zaměřené na titraci vody v nepolárních látkách (CM, Oil).

2.2.5 Aplikace se zaměřením na farmaceutické vzorky

Ve farmacii jsou analyzovány různorodé materiály jak anorganického tak organického složení, látky pevné, kapalné, polotuhé i v roztocích. Karl-Fischerova titrace se pro většinu z nich osvědčila jako rychlá a efektivní metoda. Pracovní postupy pro analýzu v jednotlivých látkách jsou dány ve většině případů lékopisy, kde jsou k nalezení jak postupy obecné společné pro více materiálů, tak i postupy speciální určené zpravidla jen pro jednu látku.

Podle vyvážených produktů, firmy používají buď lékopis český, který odpovídá lékopisu evropskému (PhEur), nebo lékopis americký (USP-NF), který se od českého v pracovních postupech mnohdy výrazně liší, a v některých případech se lze setkat i s lékopisem britským (BP).

2.2.5.1 Porovnání Českého lékopisu a USP-NF

Pro názornost uvádím srovnání obecných postupů pro titrační stanovení obsahu vody ve vzorku v českém a americkém lékopise.

Titrační činidlo

Zatímco Český lékopis již automaticky počítá s používáním běžně na trhu dostupných titračních činidel, USP-NF stále zastává laboratorní přípravu klasického Karl-Fischerova činidla, ale zároveň připouští i možnost použití prodávaných činidel. Pro přípravu Karl-Fischerova činidla USP-NF uvádí tento postup:

„Karl-Fischerovo činidlo lze připravit tímto způsobem. Přidejte 125 g jodu k roztoku obsahujícímu 670 ml methyalkoholu a 170 ml pyridinu a ochlaďte. Do 250-ml odměrného válce nalijte 100 ml pyridinu a udržujte pyridin chladný v ledové lázni, probublávejte suchým oxidem siřičitým do té doby, než objem dosáhne 200 ml. Pomalu přidejte za třepání tento roztok k chlazené jodové směsi. Protřepáním rozpustíte jod, roztok přeneste k přístroji a ponechte roztok stát přes noc před standardizací. Jeden ml tohoto čerstvě připraveného roztoku odpovídá přibližně 5 mg vody, ale postupně se kazí, proto se standardizuje 1 hodinu před použitím, nebo denně pokud je používán trvale. Při použití chraňte před světlem. Zásobní objem činidla uskladněte ve vhodně zapečetěné, uzavírací skleněné nádobě plně chráněné před světlem a chlazené“.

Stanovení titru titračního činidla

Český lékopis doporučuje ke stanovení titru titračního činidla buď čištěnou vodu nebo jakýkoliv certifikovaný materiál. USP-NF počítá s různými koncentracemi Karl-Fischerova činidla. A to, pro stanovení obsahu vody do 1 % používá činidlo o síle do 2 mg vody / ml, které faktorizuje na dihydrát vlnanu sodného, a pro obsahy vody nad 1 % používá klasické činidlo o síle 5 mg vody / ml, které faktorizuje na čištěnou vodu. Uvádí rovněž navážky uvedených materiálů (75–125 mg vlnanu sodného a 25–250 mg vody) a vzorce pro výpočet titru.

Stanovení vody ve vzorku

Oba lékopisy používají jako rozpouštědlo methanol nebo jiné vhodné rozpouštědlo, z kterého je činidlem vytitrována voda. Do takto vytitrovaného rozpouštědla je co nejrychleji diferenčně přidán vzorek, mícháním rozpuštěn a ztitrován činidlem. USP-NF kromě elektrometrické indikace připouští i vizuální indikaci bodu ekvivalence barevným přechodem „z kanárkové žluti do barvy jantaru“ a udává také množství vody, které by měla navážka vzorku obsahovat (2-250 mg). Český lékopis naopak raději ve většině případů uvádí přímé navážky vzorku v jednotlivých monografiích pro každý typ materiálu. USP-NF popisuje také postup na úpravu vzorků ve formě tablet, kapslí a sprejů a postup při práci s hydroskopickým vzorkem.

Oba lékopisy uvádí také metodu zpětné titrace, která je založená na přidavku titračního činidla v přebytku. Po zreagování veškeré vody obsažené ve vzorku, se zbylé činidlo zpětně titruje v případě Českého lékopisu použitým rozpouštědlem a v USP-NF roztokem vody v methanolu (2 ml vody doplněné na 1000 ml methanolem) s přesnou známou koncentrací vody. Tato metoda je výhodná především tehdy, kdy se voda vázaná ve vzorku velmi pomalu uvolňuje, což může být u přímé titrace problémové. Metoda zpětné titrace je však v praxi téměř nepoužívána.

3 Experimentální část

3.1 Analyzovaný vzorek

K analýze byl použit vzorek Natrii hydrogenophosphas dodecahydricus (dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), jehož obsah vody je 57,0–61,0 %. Jedná se o bezbarvou krystalickou látku, větších zrn, na vzduchu zvětrávající, snadno rozpustnou ve vodě a hůře rozpustnou v ethanolu a methanolu. Používá se jako pomocná látka pro výrobu kapek proti bolesti a nosních kapek.

Tato látka při stanovení vykazuje jisté problémy. Stanovený obsah vody se sice díky širokému rozmezí nachází v požadovaném limitu, ale není s dostatečnou přesností reprodukovatelný, a již malá odchylka od správné hodnoty může výrazně ovlivnit stanovení obsahu látky v sušině.

3.2 Použité chemikálie a činidla

Pro stanovení byl použit titrační roztok HYDRANAL-Composite 5 firmy Riedel-de Haën, a jako médium čistý Methanol p.a. firmy Merck nebo ve směsi s Formamidem p.a. firmy rovněž od firmy Merck. Titr titračního činidla je stanovován vždy po otevření nové láhve a pak jednou týdně z pěti stanovení na přesnou navážku vody.

3.3 Informace o přístrojích

Karl-Fischerova titrace byla prováděna na přístroji 841 Titrandu od firmy Metrohm s magnetickým míchadlem 803 Ti Stand, dvojitou platinovou elektrodou, titrační nádobkou o objemu 100 ml a inteligentní dávkovací jednotkou Dosino, který byl napojen na počítač (viz obr.8). Titrace byla řízena pomocí programu Tiamo, taktéž od firmy Metrohm. Titrační činidlo je dávkováno do titrační nádoby automaticky přístrojem pomocí Dosino jednotky. Plnění titrační nádoby rozpouštědlem i její vyprazdňování se děje bez otevírání systému.



Obrázek 8 - Příklad 841 Titrandu s příslušenstvím

Správnou funkci dávkovací jednotky a míchadla si lze ověřit v menu TOOLS – Manual kontrol (Dosing device a Stirrer). Titrace se provádí v menu Workplace. V okně RUN se vybere metoda, kterou má možnost uživatel si vytvořit sám, a zadají se údaje o vzorku, analýza se pak spustí příkazem START. Průběh titrace lze sledovat v okně LIVE DISPLAY 1 v záložce KF titration. Příklad nejprve vytitruje vodu přítomnou v nádobce a ve chvíli kdy je připraven pokračovat se objeví zelený nápis Conditioning OK. Poté se opět stiskne START, diferencně se odváží vzorek a zadá se navážka, která se potvrdí OK. Po skončení titrace se objeví příslušný report dané analýzy v okně REPORT v záložce Current report. Měření se ukončí stisknutím STOP.

Pro stanovení vody ztrátou sušením byla použita horkovzdušná sušárna Binder s nastavitelnou teplotou.

Vzorek byl navažován s přesností na čtyři desetinná místa analytických vahách Mettler Toledo.

3.4 Pracovní postup

Předepsaná lékopisná metoda uvádí: „Voda se stanoví s 50,0 mg zkoušené látky. Jako rozpouštědlo se použije směs objemových dílů methanolu bezvodého R a formamidu R (10+40)“, což činí 80 % formamidu ve směsi, materiály firmy Sigma-Aldrich však uvádějí,

že je vhodné použít směs s maximálně 50 % formamidu. Proto byly pro analýzu používány směsi o různém složení methanolu a formamidu.

Voda ve vzorku byla také stanovena ztrátou sušením dle metody výrobce analyzovaného materiálu, která uvádí: „navážku 1 g sušte při 130°C do konstantní hmotnosti“.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Podmínky, které mohou ovlivnit průběh titrace

Průběh stanovení vody v dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného může být ovlivněn **teplotou**, jejíž zvýšení by mohlo mít pozitivní vliv na snadnější rozpouštění vzorku, které za normálních podmínek trvá i 30 minut. Zjišťování jejího vlivu na titraci bylo však zamítnuto z důvodu nedostatečného vybavení.

Na stanovení může mít také vliv **pH** roztoku v nádobce, které by mohlo vzhledem k zásaditosti vzorku a formamidu způsobovat rozklad činidel (viz kapitola 2.2.3.2). Tento parametr nebyl rovněž zkoumán z důvodu bezvodého prostředí, které není vhodné pro měření pH. Možným řešením by mohl být i HYDRANAL-Methanol Rapid, který by mohl pH upravovat. Firma však z finančních důvodů toto médium pro běžná stanovení nepoužívá.

Vzorek obsahuje poměrně **velké krystaly** a velmi dlouho se rozpouští. Krystaly by bylo vhodné rozmělnit na menší částice, ale při tření v třecí misce by však mohlo dojít ke změnám obsahu vody.

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.4, předepsaná směs obsahuje **80 % formamidu** oproti maximálně doporučeným 50 %. Není známá ani funkce formamidu. Vzorek je anorganického původu a v methanolu je rozpustný, tudíž není třeba ani extrakčního činidla.

Na vzduchu dochází k poměrně rychlému **rozkladu vzorku**, který vede k výraznému snížení obsahu vody. Vzorek nápadně bělá, ochlazuje se, zmenšuje svůj objem a začne se lepit na stěny nádob. Pravděpodobně dochází k jeho přechodu z dodekahydrátu na stabilnější dihydrát. Na základě tohoto zjištění byl zkoumaný vzorek ihned na počátku pro jednotlivá stanovení rozdělen do menších lékovek, aby častým otevíráním lékovky nedocházelo k jeho rozkladu. Proto je také prováděno jednotlivé ověření analýz z pěti stanovení namísto původně zamýšlených deseti. Z tohoto důvodu je nutný co nejrychlejší převod navážky vzorku do titrační nádoby.

Další problém může skýtat **velmi malá navážka** – 50 mg. Jen velmi těžko lze zabránit, aby na stěnách otvoru pro vsypávání vzorku žádný materiál neulpěl. Při takto malých navážkách se jedná o velmi závažný problém. Je nutno vyřešit kvantitativní převod navážky do titrační nádoby.

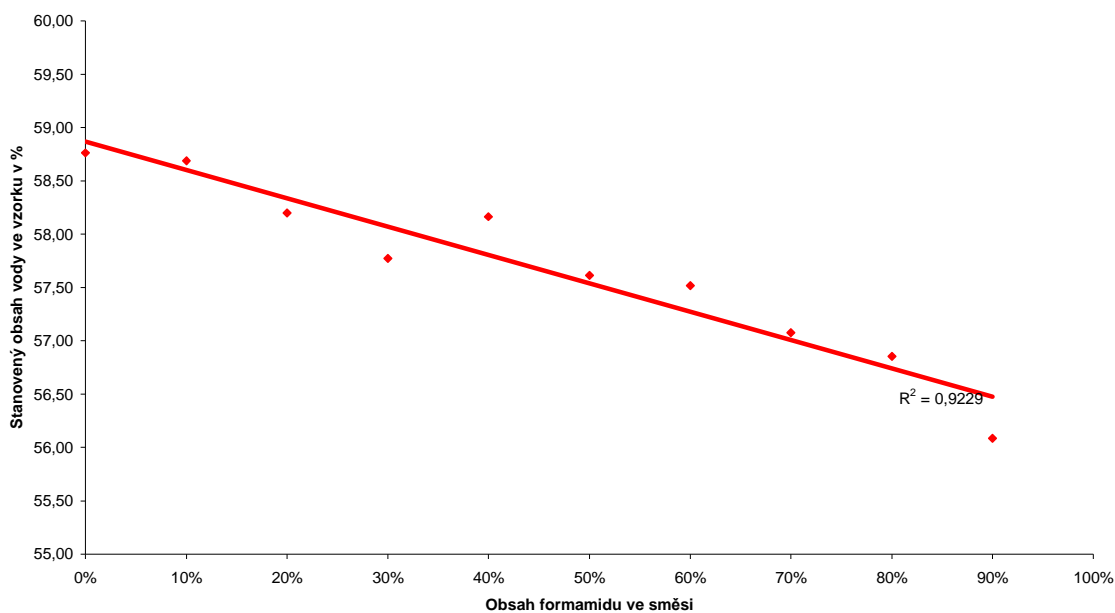
4.2 Nalezení optimálního složení rozpouštěcí směsi

Vzorek byl rozdělen do deseti vzorkovnic po cca 0,5 g, aby se zabránilo vlivu postupného zvětrávání vzorku. Z každé vzorkovnice pak bylo provedených pět stanovení pro deset typů složení směsi - 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % a 90 % formamidu v methanolu a pro každý typ spočítán stanovený průměrný obsah vody a RSD stanovení (viz *tabulka 1*).

Tabulka 1- Nalezení optimálního složení rozpouštěcí směsi

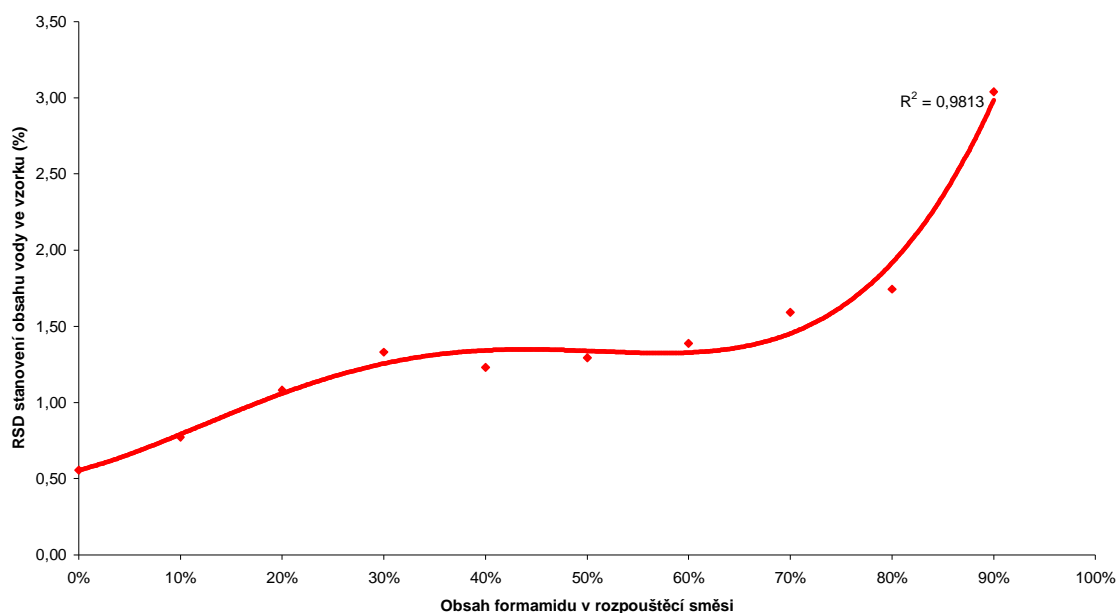
Stanovený obsah vody (%)	Obsah formamidu v rozpouštěcí směsi									
	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
1	59,16	59,09	58,67	57,49	58,98	56,38	6,52	58,60	58,06	57,40
2	58,60	59,08	58,84	57,35	58,56	57,81	8,74	56,32	57,21	55,84
3	58,92	58,80	58,31	56,93	57,83	57,51	7,51	56,46	55,54	53,23
4	58,30	58,04	57,92	58,84	58,31	58,18	7,30	57,02	57,27	56,80
5	58,83	58,43	57,27	58,27	57,12	58,19	7,51	56,97	56,19	57,16
Průměr	58,76	58,69	58,20	57,77	58,16	57,61	7,52	57,07	56,86	56,09
RSD (%)	0,56	0,77	1,08	1,33	1,23	1,29	1,39	1,59	1,74	3,04

Závislost stanoveného obsahu vody ve vzorku na složení rozpouštěcí směsi



Graf 1 – Závislost obsahu vody na složení rozpouštěcí směsi

Závislost RSD stanovení obsahu vody ve vzorku na složení rozpouštěcí směsi

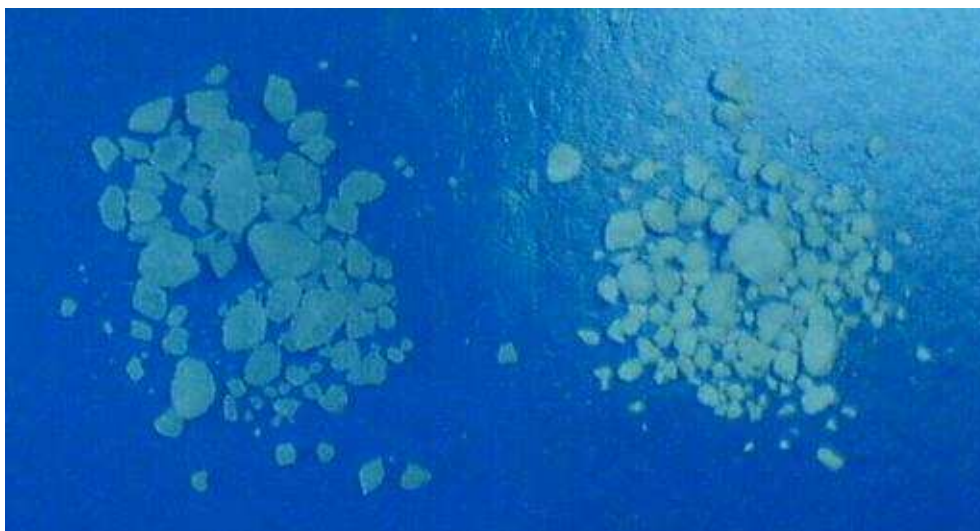


Graf 2 – Závislost RSD na složení rozpouštěcí směsi

Ze získaných výsledků vyplývá, že nejideálnější složení směsi pro stanovení je čistý methanol bez přídavku formamidu. Ten je použitelný pouze do obsahu 10 % ve směsi, ve větším množství výrazně negativně ovlivňuje reakci, tj. snižuje stanovený obsah vody (viz *graf 1*) a přesnost stanovení (viz *graf 2*).

4.3 Zvětrávání vzorku

Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.1 dochází na vzduchu k poměrně rychlému rozkladu vzorku, který vede k výraznému snížení obsahu vody, kdy pravděpodobně dochází k jeho přechodu z dodekahydrátu na stabilnější dihydrát (viz. *obr.9*).



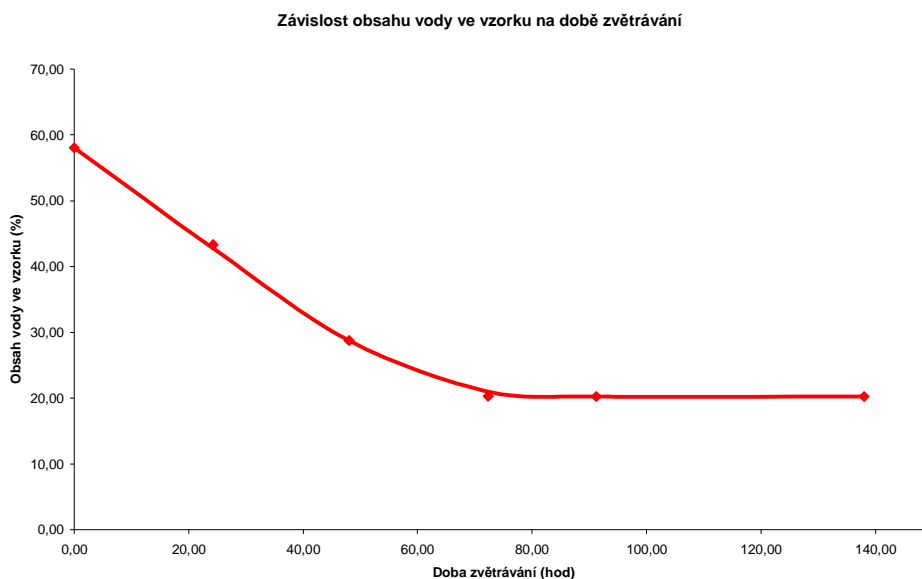
Obrázek 9 a) původní vzorek

b) zvětraný vzorek

Vzorek byl po 1 g navážen do pěti váženek a vždy po určité době byly váženky převáženy a byl spočítán průměrný úbytek vzorku a aktuální obsah vody ve vzorku (viz tabulka 2).

Tabulka 2 - Zvětrávání vzorku

Doba zvětrávání (hod)	Úbytek vzorku (g)	Obsah vody (%)
0,00	0,0000	58,06
24,24	0,2690	43,32
48,03	0,4272	28,75
72,32	0,4952	20,32
91,22	0,4958	20,24
138,05	0,4958	20,23



Graf 3 – Závislost obsahu vody na době zvětrávání

Lékopisné metody uvádí, že obsah vody v dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného obsahuje 57,0-61,0 % vody, dihydrát pak 19,5-21,0 %. Vzhledem k tomu, že se obsah vody ve vzorku ustálil na hodnotě 20,2 %, bylo potvrzeno, že zkoumaný vzorek skutečně přechází na dihydrát, což potvrzuje nutnost co nejrychlejšího převedení navážky vzorku do titrační nádoby.

4.4 Stanovení obsahu vody ve vytvořené miniaturní váženke

Jak bylo zjištěno (viz kapitola 4.3), je skutečně nutný co nejrychlejší a co nejkvantitavnější převod navážky do titrační nádoby. Je možné použít miniaturní váženku, do které se vzorek naváží a celý i s váženkou vhodí do titrační nádoby. Použitý materiál musí být nevodivý, lehký, hydrofobní, v methanolu nerozpustný dostatečně pevný a snadno dostupný. Takováto váženka byla vyrobena z chemicky odolného plastového kapátka (viz obr. 10).



Obrázek 10 - Miniaturní váženka

Bylo vyrobeno pět výše uvedených váženek a v nich provedeno pět stanovení vody v čistém methanolu. Získané hodnoty byly zprůměrnovány a spočteno jejich RSD (viz *tabulka 3*).

Tabulka 3 - Stanovení vody titračně v miniaturní váženke

	Stanovený obsah vody (%)
<i>1</i>	60,13
<i>2</i>	59,95
<i>3</i>	59,39
<i>4</i>	59,49
<i>5</i>	59,86
Průměr	59,76
RSD (%)	0,53

S vytvořenou váženkou bylo dosaženo poměrně dobrých výsledků. Obsah vody je dostatečně vysoký a přesný. Přes pečlivý výběr materiálu se ale ukázalo, že váženky jsou stále příliš těžké a poměrně silně při míchání narážejí do elektrody. Vhodnější materiál, ale zatím bohužel nebyl nalezen.

4.5 Ztráta sušením

Pro srovnání byl obsah vody ve vzorku stanoven také ztrátou sušením. Stanovení bylo provedeno v pěti předem vysušených a zvážených váženkách, do kterých bylo naváženo po 1 g vzorku. Vzorek byl pak sušen při 130°C v horkovzdušné sušárně do konstantní hmotnosti (viz *tabulka 4*) a opět byl spočítán průměrný výsledek a RSD stanovení.

Tabulka 4 - Stanovení vody ztrátou sušením

	Ztráta sušením (%)
<i>1</i>	59,51
<i>2</i>	59,48
<i>3</i>	59,48
<i>4</i>	59,45
<i>5</i>	59,43
Průměr	59,47
RSD (%)	0,04

Stanovení ztrátou sušením se ukázalo jako velmi přesné.

4.6 Vyhodnocení získaných výsledků

Analyzovaný vzorek má obsah vody stanovený titračně deklarovaný výrobcem 60,5 %. Klasickým provedením titrace v čistém methanolu, který se prokázal jako nejvhodnější médium (viz kapitola 4.2), diferenčně bez použití váženky bylo dosaženo výsledku $58,8 \pm 0,4$ % a s použitím váženky $59,8 \pm 0,4$ %.

Ztrátu sušením deklaruje výrobce ve výši 60,2 %. Analýzou bylo zjištěno $59,5 \pm 0,0$ %.

Ze získaných výsledků vyplývá, že použití miniaturních váženek výrazně zvýšilo správnost výsledku, která je srovnatelná se ztrátou sušením. Přesnost stanovení však zůstává zcela stejná jako u diferenčního stanovení. Jako nejideálnější způsob stanovení obsahu vody v této látce, za daných okolností, se jeví ztráta sušením, která je velice přesná a poskytuje dostatečně správné výsledky.

5 Závěr

Na počátku této diplomové práce byly prostudovány dostupné materiály týkající se stanovení vody ve farmaceutických vzorcích. Největší pozornost byla věnována titrační metodě podle Karl Fischera.

V průběhu práce byla vyrobena miniaturní váženka z plastového kapátka pro dokonalý převod navážky do titrační nádoby. Výrazně přispěla ke zvýšení přesnosti stanovovaného obsahu.

Stanovení vody bylo prováděno za použití činidla HYDRANAL-Composite na přístroji 841 Titrandu od firmy Metrohm se softwarem Tiamo. Přístroj sám veškeré obsahy vody vyhodnotil. Pro zjištění správného obsahu vody se měření provádělo několikrát a aritmetický průměr a relativní standardní odchylka byly počítány pomocí vzorců v programu EXCEL.

Voda byla stanovována ve vzorku dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného, u kterého ve většině případů docházelo k nepříliš přesným a správným výsledkům. U tohoto vzorku bylo voleno optimální složení rozpouštěcí směsi a řešení rychlé a kvantitativní převod vzorku do titrační nádoby. Dále u tohoto vzorku bylo zkoumáno jeho zvětrávání na vzduchu. Obsah vody stanovený metodou dle Karl Fischera byl srovnán s hodnotou získanou ztrátou sušením v horkovzdušné sušárně firmy Binder.

Všechny získané hodnoty byly tabelárně i graficky zpracovány viz *graf 1-3* a *tab. 1-4*.

Pro stanovení vody v analyzovaném materiálu se na základě jeho vlastností ukázala jako výhodnější metoda ztrátou sušením.

6 Použitá literatura

1. Vydra F., Štulík K.: Biamperometrické titrace (SNTL, 1971), *str. 11-18, 105 -111*
2. Fexa J., Široký K.: Měření vlhkosti (SNTL, 1983), *str. 15-21*
3. Český normalizační institut: ČSN ISO 760 Stanovení vody (Český normalizační institut, 1998)
4. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2009 (Grade Publishing, 2009), *str. 114, 195-196*
5. United States Pharmacopeial Convention: USP-NF 2009 (United Book Press, 2009), *kap. 731 a 921*
6. Graeberová K.: Diplomová práce (Univerzita Pardubice, 1998)
7. Hoffmann H., Felgner A.: Analytix - Notes (Sigma Aldrich, 2005)
8. Klouda P.: Analytická chemie-Elektrochemické metody (VÚROM Ostrava Zábřeh, 1994), *str.32-37*
9. Teva Opava: Firemní dokument NO\PQC\112 Automatický titrátor 841 KF za použití softwaru Tiamo (Teva Opava, 2009)
10. Teva Opava: Firemní dokument SS\PQC\1526703\V1 Natrii Hydrogenophosphas dodecahydricus (Teva Opava, 2006)
11. Sigma Aldrich, Mettler Toledo, Donau Lab: Nепublikované materiály ze semináře - „HYDRANAL - řada činidel pro stanovení obsahu vody titrací podle Karl Fischera“ (Sigma Aldrich, 2008)
12. Hoffmann H., Felgner A.: Analytix - Advances in Analytical Chemistry (Sigma Aldrich, 2000)